

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 27 January 2000 (27.01.00)	
International application No.: PCT/JP99/03859	Applicant's or agent's file reference: C2-003PCT
International filing date: 16 July 1999 (16.07.99)	Priority date: 17 July 1998 (17.07.98)
Applicant: SUGIHARA, Takashi et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:
16 July 1999 (16.07.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

BEST AVAILABLE COPY

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 28 February 2001 (28.02.01)	
International application No. PCT/JP00/03859	Applicant's or agent's file reference NOK-20-700-P
International filing date (day/month/year) 14 June 2000 (14.06.00)	Priority date (day/month/year) 18 June 1999 (18.06.99)
Applicant KOBAYASHI, Osamu et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
 22 December 2000 (22.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Henrik Nyberg Telephone No.: (41-22) 338.83.38
--	--

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 C2-003PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/03859	国際出願日 (日.月.年) 16.07.99	優先日 (日.月.年) 17.07.98
出願人(氏名又は名称) 株式会社中外分子医学研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/DDBJ/EMBL/GENESEQ
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Mol. Endocrinol., 5, p. 628-636, 1991 De, S. K., et al., "High level of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse"	1-9
A	Biochem. J., 231, p. 279-283, 1985 Deagen, J. T. et al., "Properties of cadmium-binding proteins in rat testes. Characteristics unlike metallothionein"	1-9
A	Biochem. J., 231, p. 375-382, 1985 Hunziker, P. E. et al., "Isolation and characterization of six human hepatic isometallothioneins"	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.10.99

国際調査報告の発送日

02.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

印

4 B

9838

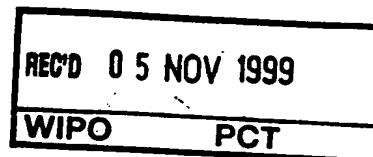
電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き): 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Toxicology, 107, p. 121-130, 1996 McKenna, I. M., et al., "Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated"	1-9
A	Histochemistry, 101, p. 341-346, 1994 Tohyama, C., et al., "Metallothionein mRNA in the testis and prostate of the rat detected by digoxigenin-labeled riboprobe"	1-9
A	J. Biol. Chem., 261, p. 13097-13103, 1986 Waalkes, M. P. et al., "Isolation of a novel metal-binding protein from rat testes. Characterization and distinction from metallothionein"	1-9

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕



出願人又は代理人 の書類記号 C2-003PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/03859	国際出願日 (日.月.年) 16.07.99	優先日 (日.月.年) 17.07.98
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁸ C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18		
出願人(氏名又は名称) 株式会社中外分子医学研究所		

- 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。
- この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。
☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。
- この国際予備審査報告は、次の内容を含む。
 - ☒ 国際予備審査報告の基礎
 - ☐ 優先権
 - ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
 - ☐ 発明の単一性の欠如
 - ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
 - ☐ ある種の引用文献
 - ☐ 国際出願の不備
 - ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 16.07.99	国際予備審査報告を作成した日 12.10.99	
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 内田 俊生 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9838

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無
進歩性 (IS)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1 - 9	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1-9に記載されている発明は、先行技術のうちに該当するものがなく、かつ、当該技術分野の専門家にとって先行技術からみて自明のものでもない。

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference C2-003PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/03859	International filing date (day/month/year) 16 July 1999 (16.07.1999)	Priority date (day/month/year) 17 July 1998 (17.07.1998)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18		
Applicant CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 16 July 1999 (16.07.1999)	Date of completion of this report 12 October 1999 (12.10.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No. (81-3) 3581 1101

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03859

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03859

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The subject matter of claims 1-9 does not correspond to any prior art, nor is it considered to be obvious to a specialist in the technical field in question on account of prior art.



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/04147</p> <p>(43) 国際公開日 2000年1月27日(27.01.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03859</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月16日(16.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/219856 1998年7月17日(17.07.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 株式会社 中外分子医学研究所(CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.)[JP/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153番地2 Ibaraki, (JP) 工業技術院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY)[JP/JP] 〒100-8921 東京都千代田区霞が関1丁目3-1 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 杉原 崇(SUGIHARA, Takashi)[JP/JP] ワダワ レヌー(WADHWA, Renu)[IN/JP] 〒300-4101 茨城県新治郡新治村永井153-2 株式会社 中外分子医学研究所内 Ibaraki, (JP)</p>		<p>カウル スニル シー(KAUL, Sunil C)[IN/JP] 三井洋司(MITSUI, Youji)[JP/JP] 〒305-8566 茨城県つくば市東1-1-3 工業技術院 生命工学工業技術研究所内 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 清水初志; 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: DIFFERENTIATION REGULATORY FACTOR EXPRESSED SPECIFICALLY IN TESTIS</p> <p>(54)発明の名称 精巣特異発現性分化制御因子</p> <p>(57) Abstract A gene expressed specifically in the testis which has been unexpectedly isolated by chance in the course of studies on the expression of a gene encoding an unknown protein causing cell death. As the results of the analysis on the thus isolated gene, it is suggested that this gene has a novel gene sequence showing no significant homology with any gene on the data base and participates in the regulation of testis differentiation.</p>		

(57)要約

細胞死を引き起こす未知のタンパク質をコードする遺伝子の発現を検討していたところ、偶然にも、初期の目的とは異なる精巣特異的に発現する遺伝子を単離するに至った。単離した遺伝子につき解析を行ったところ、該遺伝子はデータベース上に有意な相同性を示す遺伝子が存在しない新規な遺伝子配列であり、また精巣の分化制御に関与していることが示唆された。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦	DM ドミニカ	KZ カザフスタン	RU ロシア
AL アルバニア	EE エストニア	LC セントルシア	SD スーダン
AM アルメニア	ES スペイン	LI リヒテンシュタイン	SE スウェーデン
AT オーストリア	FI フィンランド	LK スリ・ランカ	SG シンガポール
AU オーストラリア	FR フランス	LR リベリア	SI スロヴェニア
AZ アゼルバイジャン	GA ガボン	LS レソト	SK スロヴァキア
BA ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB 英国	LT リトアニア	SL シエラ・レオネ
BB バルバドス	GD グレナダ	LV ラトヴィア	SN セネガル
BE ベルギー	GE グルジア	MA モロッコ	SZ スワジランド
BF ブルキナ・ファソ	GH ガーナ	MC モナコ	TD チャード
BG ブルガリア	GM ガンビア	MD モルドヴァ	TG トーゴ
BJ ベナン	GN ギニア	MG マダガスカル	TJ タジキスタン
BR ブラジル	GW ギニア・ビサウ	MK マケドニア	TZ タンザニア
BY ベラルーシ	GR ギリシャ	ML マリ	TM トルクメニスタン
CA カナダ	HR クロアチア	ML モンゴル	TR トルコ
CF 中央アフリカ	HU ハンガリー	MN モンリタニア	TT トリニダード・トバゴ
CG コンゴ	ID インドネシア	MR モーリタニア	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	MW マラウイ	UG ウガンダ
CI コートジボアール	IL イスラエル	MX メキシコ	US 米国
CM カメルーン	IN インド	NE ニジェール	UZ ウズベキスタン
CN 中国	IS アイスランド	NL オランダ	VN ヴェトナム
CR コスタ・リカ	IT イタリア	NO ノールウェー	YU ユーゴスラビア
CU キューバ	JP 日本	NZ ニュー・ジラント	ZA 南アフリカ共和国
CY キプロス	KE ケニア	PL ポーランド	ZW ジンバブエ
CZ チェッコ	KG キルギスタン	PT ポルトガル	
DE ドイツ	KP 北朝鮮	RO ルーマニア	
DK デンマーク	KR 韓国		

明細書

精巣特異発現性分化制御因子

技術分野

本発明は、精巣細胞の分化に関与するタンパク質および遺伝子に関し、生物科学分野、詳しくは発生生物の分野に属する。

背景技術

発生過程の中で、生殖細胞は体細胞とは異なる減数分裂を含む分化過程を経て精子形成を行う。これら精子形成の分化過程の段階は大きく分けて三つある。第一段階は、精原細胞の増殖と精母細胞への分化、第二段階は精母細胞の減数分裂、第三段階は精子への変態である。

近年、分子生物学の発達により、これらのステージに特異的な遺伝子発現をする遺伝子がいくつか単離された。例えば、精母細胞特異的な遺伝子として、Hox-1.4 (Propst, F. et al. (1988) Oncogene 2:227-33)、HSP70 のファミリーである ferT (Sarge, K. D. et al., (1994) Biol Reprod 50:1334-1343)、セリンスレオニンキナーゼである TESK1 (Toshima, J. et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:31331-31337) が報告されている。しかしながら、これらの遺伝子産物についての生物的及び物理的な役割については、いまだ知見に乏しい。

生殖細胞の分化過程特異的な発現をする遺伝子はそれぞれの生殖細胞の運命を決定づける基本的で重要な役割を担っており、その異常は不妊疾患などの原因となることが予想される。このため生殖細胞の分化過程に特異的な発現を示す遺伝子は、不妊疾患など生殖細胞分化の異常に起因する疾患の予防または治療のための医薬品開発の標的として、近年注目されている。

発明の開示

本発明は、精巣細胞の分化に係る新規なタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子を提供する。また、本発明は、該タンパク質の製造などに用いられるベクター、形質転換体、および該タンパク質の製造方法を提供する。さらに、本発明は、該遺伝子の単離、検出などに用いられるオリゴヌクレオチドを提供する。

本発明者等は、細胞死を引き起こす未知のタンパク質をコードする遺伝子の発現を検討していたところ、偶然にも、初期の目的とは異なる、精巣特異的に発現する新規な遺伝子を単離するに至った。本発明者等は、単離した遺伝子につきデータベース検索を行ったところ、該遺伝子はデータベース上に有意な相同性を示す遺伝子が存在しない新規な遺伝子であった。該遺伝子がコードするタンパク質の構造につき解析を行ったところ、タンパク質はその一部において金属結合因子として知られているメタロチオネインの金属結合部位と同様な構造を保持していた。組織における発現解析においては、該遺伝子は精巣、特に精母細胞において極めて特異的に発現していた。一方、不妊マウスの精巣においては、その発現が認められなかった。また、マウス、ヒト染色体における該遺伝子の存在位置につき解析を行ったところ、不妊マウスとして異常が知られている遺伝子座と同様の場所に存在していた。これらの解析結果から、単離した遺伝子がコードするタンパク質が精巣の分化制御に関与していると考えられる。

本発明は、金属結合部位を有し、精巣分化の制御に関与する新規なタンパク質及びその遺伝子に関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：4または5に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、
- (2) 配列番号：4または5に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、および／または付加したアミノ酸配列からなり、(1)に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(3) 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなる DNA にハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、(1)に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(4) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA、

(5) (4) に記載の DNA を含むベクター、

(6) (4) に記載の DNA を発現可能に保持する形質転換体、

(7) (6) に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する行程を含む、(1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質を製造する方法、

(8) (1) から (3) のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体、

(9) 配列番号：1から3のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA に特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有する DNA、を提供するものである。

本発明は、精原細胞から精母細胞への分化を制御していると考えられる Tesmin タンパク質およびその遺伝子を提供する。

本発明者らは、転写過程におけるスプライシングの相違によると考えられる 2 種類のマウス由来の Tesmin cDNA を単離した。これら cDNA の塩基配列を配列番号：1 および配列番号：2 に、これら cDNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4 に示す。また、本発明者らにより単離されたヒト由来の Tesmin cDNA の塩基配列を配列番号：3 に、該 cDNA によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：5 に示す。

配列番号：1 および 2 に示すように、マウス由来の Tesmin cDNA は、295 アミノ酸からなるタンパク質をコードする ORF を有する。一方、配列番号：3 に示すように、ヒト由来の Tesmin cDNA は 299 アミノ酸からなるタンパク質をコードする ORF を有する。³⁵S ラベルしたメチオニンを用いたマウス Tesmin インビトロ翻訳産物の SDS-PAGE 解析の結果、マウスの Tesmin タンパク質は 32.5kDa

の分子量を示した（図 3）。

また、ノーザンブロット解析及び RT-PCR 法解析により、マウスおよびヒト Tesmin 遺伝子は、それぞれ生体内組織の中で精巣にのみ発現している遺伝子であることが示された（図 1、2）。RT-PCR 法による解析において、Tesmin 遺伝子は、生後 8 日目までの未分化の状態ではほとんど発現が見られず、精分化が始まる 12 日目以降発現が高まり、生後 18 日目以降安定して高発現となる遺伝子であるということが示された。不妊マウスとして知られている、増殖因子レセプター「c-kit」遺伝子を欠損した W/W^v マウスにおいては、成熟した生後 52 日目においても、Tesmin 遺伝子の発現がほとんど見られなかった（図 4）。これらの事実は、Tesmin タンパク質が、精巣の分化に関与していることを示唆する。Tesmin タンパク質やその遺伝子は、例えば、不妊病の治療などへの応用が考えられる。

本発明の Tesmin タンパク質は、該タンパク質をコードする DNA（例えば、配列番号：1 から 3 に記載の塩基配列を有する DNA）を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体から精製することにより調製することが可能である。さらに、遺伝子組み換え技術を利用した組み換えタンパク質として、後述するように Tesmin タンパク質をコードする DNA で形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。一方、天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば後述の Tesmin タンパク質に結合する抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、精巣組織から単離することが可能である。

また、当業者であれば、天然型の Tesmin のみならず、公知の方法を用いてタンパク質中のアミノ酸の置換などを適宜行い、天然型のタンパク質と同等の機能を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加などにより天然型のタンパク質に対してアミノ酸配列が変異した変異

体であって、天然型のタンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、PCR による部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Martland)、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. and Frits, HJ (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367)、Kunkel 法 (*Methods Enzymol.* 85, 2763-2766(1988))などが挙げられる。アミノ酸の変異数は、通常、10 アミノ酸以内であり、好ましくは6 アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3 アミノ酸以内である。

本発明において「機能的に同等」とは、変異タンパク質が、天然型のタンパク質と同様の生化学的活性および／または生物学的活性を有することを指す。これら活性としては、例えば、タンパク質の金属との結合活性や精巣細胞の分化誘導活性が挙げられる。

金属との結合活性の検出は、例えば、以下のように行なうことができる。まず、リコンビナント Tesmin タンパク質を EDTA 処理し、Tesmin タンパク質に結合していると考えられる重金属を取り除く。次に、EDTA をゲル濾過で取り除き、測定したい重金属 (例えば、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} など) を加え、リコンビナント Tesmin タンパク質と反応させる。反応後、CD spectropolarimeter (Jasco 社製 J-500C) を用いて、金属結合の有無を CD spectra を用いて測定する (Presta A, et al., *Eur. J. Biochem* Jan 15 ; 227(1-2) : 226-240 参照)。

また、精巣細胞分化誘導活性の検出は、例えば、以下のように行なうことができる。まず、マウスの精巣より遠心分離法により、精祖細胞、精原細胞、精母細胞を単離する。次に、Tesmin 遺伝子を発現ベクター (例えば、pBK-CMV ベクター、stratgene 社) に組み込み、この組み込みを行った遺伝子をリポフェクタミン (GIBCO BRL 社製) により単離した細胞に導入し、数時間から数日間培養の後、分化の時期を同定する遺伝子マーカー (例えば、MEG1 や ssH2B など) の発現を RT-PCR 法により確認する。

また、機能的に同等なタンパク質を単離するための他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab.press, 1989)が当業者によく用いられている。即ち、当業者であれば、マウス、ヒト由来の Tesmin タンパク質をコードする DNA (配列番号: 1 から 3 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA) またはその一部を基に、これと相同性の高い DNA を単離して、該 DNA からマウス、ヒト由来の Tesmin タンパク質と機能的に同等なタンパク質を得ることも通常行いうることである。このようにマウス、ヒト由来の Tesmin タンパク質をコードする DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、これらタンパク質と機能的に同等なタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。ハイブリダイズする DNA を他の生物から単離する場合には、これらに制限されないが、例えば、ラット、ウサギ、ウシなどが用いられた場合、精巢の組織が単離に適している。ハイブリダイズ技術により単離される DNA は、通常、マウス、ヒト由来の Tesmin タンパク質をコードする DNA (配列番号: 1 から 3 のいずれかに記載の塩基配列からなる DNA) と高い相同性を有する。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて少なくとも 40%以上、好ましくは 60%以上、さらに好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 95%以上の配列の同一性を指す。配列の相同性は、例えば、文献 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726, 1983) に記載の方法により算出することができる。

このような相同性の高い DNA を単離するためのハイブリダイゼーションの条件(ストリンジェントな条件)の例を示せば、以下の如くである。即ち「Rapid-hyb buffer」(Amersham LIFE SCIENCE 社製)を用い、68°Cで 30 分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68°Cで 1 時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2XSSC, 0.01% SDS 中、室温で 20 分の洗浄を 3 回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS 中、37°Cで 20 分の洗浄を 3 回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS 中、50°Cで 20 分の洗浄を 2 回行

う。

また、本発明は、上記本発明の Tesmin タンパク質をコードする DNA を提供する。本発明の DNA は、上記本発明の Tesmin タンパク質をコードする限り、cDNA の他、ゲノム DNA や合成 DNA などにも含まれる。本発明の DNA は、例えば、組み換えタンパク質の生産に利用する。即ち、本発明の DNA (例えば、配列番号：1、2) を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより組み換えタンパク質を調製することが可能である。組み換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS 細胞、CHO 細胞、NIH3T3 細胞などの哺乳類細胞、Sf9 細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌 (E.coli) が挙げられるが、これらに制限されない。また、細胞内で組み換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしては pcDNA3 (Invitrogen 社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322) などが、昆虫細胞のベクターとしては Bac-to-BAC baculovirus expression system (GIBCO BRL 社製) などが、酵母細胞のベクターとしては Pichia Expression Kit (Invitrogen 社製) などが、大腸菌のベクターとしては pGEX-5X-1 (Pharmacia 社製)、QIAexpress system (Qiagen 社製) などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAE デキストラン法、カチオニックリボソーム DOTAP (ベーリンガーマンハイム社製) を用いた方法、エレクトロポレーション法、塩化カルシウム法などの方法を用いて行うことができる。また、形質転換体の培養は、形質転換体の性質に応じて、当業者の公知の方法で行うことができる。得られた形質転換体からの組み換えタンパク質の精製は、当業者に公知の方法、例えば、文献「The QIAexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

本発明の DNA は、その変異に起因する疾患の遺伝子治療に用いることも考え

られる。特に、Tesmin 遺伝子は、遺伝病である不妊マウスの原因遺伝子である可能性が考えられるため、不妊病の遺伝子治療への応用が期待される。遺伝子治療に用いる場合には、本発明の DNA を、例えば、アデノウイルスベクター（例えば、pAdexLcw）やレトロウイルスベクター（例えば、pZIPneo）などのウイルスベクターや非ウイルスベクターに挿入して、生体内の標的部位へ投与する。投与方法は、*ex vivo* 法であっても、*in vivo* 法であってもよい。

また、本発明は、上記本発明のタンパク質に結合する抗体を提供する。本発明の抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。これら抗体は当業者に公知の方法により調製することができる。ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のタンパク質（または部分ペプチド）をウサギなどの小動物に免疫し、血清を得て、これを例えば、硫酸沈殿、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムなどにより精製することで調製することができる。また、モノクローナル抗体は、以下のようにして調製することができる。まず、本発明のタンパク質（または部分ペプチド）をマウスなどの小動物に免疫し、該マウスより脾臓を抽出し、これをすり潰して細胞にし、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬を用いて融合させ、これにより得られた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、これらタンパク質に対する抗体を産生するクローンを選抜する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、該マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテイン A カラム、プロテイン G カラムなどにより精製する。これにより調製された抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に利用できる他、抗体治療などへの応用も考えられる。得られた抗体を抗体治療などの目的で人体へ投与する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト型の抗体を用いると有効である。抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体産生細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部位を既存のヒト抗体に移植する CDR グラフト法などが知られている。また、免疫系をヒトのものを入れ換

えたマウスを本発明のタンパク質で免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様にヒト抗体を調製することもできる。

また、本発明は、上記本発明の Tesmin タンパク質をコードする DNA と特異的にハイブリダイズし、少なくとも 15 ヌクレオチドの鎖長を有する DNA を提供する。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジेंटなハイブリダイゼーション条件下で、Tesmin タンパク質以外のタンパク質をコードする DNA とクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを指す。このような DNA は、Tesmin タンパク質をコードする DNA を検出、単離するためのプローブとして、また増幅するためのプライマーとして利用可能である。Tesmin 遺伝子は精巣のみに発現し、また精巣の中でも限定された時期にのみ発現している。このため、これらの DNA は精巣分化のマーカー（検査薬）として利用することが可能である。また、Tesmin 遺伝子は、遺伝病である不妊マウスの原因遺伝子である可能性が考えられるため、これら DNA は、不妊病の検査に利用することも考えられる。

図面の簡単な説明

図 1 は、マウスの様々な組織における Tesmin 遺伝子の発現をノーザンブロット解析した結果を示す電気泳動写真である。

図 2 は、ヒトの様々な組織における Tesmin 遺伝子の発現をノーザンブロット解析した結果を示す電気泳動写真である。

図 3 は、インビトロトランスレーションにより発現させたマウス Tesmin タンパク質の分子量を検出した結果を示す電気泳動写真である。

図 4 は、ICR ストレインマウスの生後 4 日、8 日、12 日、18 日、42 日目の精巣、および 56 日目の W/Wv ストレインマウスの精巣における Tesmin 遺伝子の発現をノーザンブロット解析した結果を示す電気泳動像である。精巣分化のマーカーとして「MEG1」および「ssH2B」を用いた。また、対照として「GAPDH」を

用いた。

図5は、精巣組織における Tesmin 遺伝子の発現をインシチュウ・ハイブリダイゼーションで検出した結果を示す顕微鏡写真である。

図6は、Tesmin 遺伝子に特異的なプローブを用いてマウス染色体における Tesmin 遺伝子の存在を検出した結果を示す顕微鏡写真および存在位置を示す模式図である。

図7は、Tesmin 遺伝子に特異的なプローブを用いてヒト染色体における Tesmin 遺伝子の存在を検出した結果を示す顕微鏡写真および存在位置を示す模式図である。

図8は、完全な Tesmin タンパク質およびその欠失変異体の細胞内での局在性を検出した顕微鏡写真である。

図9は、調製した抗 Tesmin 抗体を用いて、Tesmin タンパク質 (GST との融合タンパク質) をウェスタンブロッティングにより検出した結果を示す。抗 GST 抗体を用いた検出も併せて行なった。「IPTG+」は、cDNA を導入した大腸菌にイソプロピル- β -D-チオガラクトシド (IPTG) を添加して組換えタンパク質の発現を誘導した後、その細胞溶解液に対して SDS-PAGE を行ない、ウェスタンブロッティングにより検出したものであり、「IPTG-」は、IPTG を添加しない大腸菌の細胞溶解液を用いて検出したものである。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【実施例1】 RT-PCR を用いた Tesmin の遺伝子断片の単離

新規物質 WF-1 (1700bp を有する機能未知の新規遺伝子) の各臓器における発現を RT-PCR 法によって解析した。具体的には、アイソジェン (日本ジーン社製) を用いて、ICR ストレインマウス (日本クレア社製) の脳、肝臓、脾臓、腎臓、

心臓、精巣からトータル RNA を抽出した。RNA は 65°C で変性させた後、リバーストランスクリプターゼ：スパースクリプト 2 (GIBCO/BRL 社製) を用い cDNA を作成した。それぞれの臓器の cDNA を用い、配列番号：6 および 7 に記載の WF-1 増幅用のオリゴプライマーを用い、94°C で 1 分、58°C で 2 分、72°C で 3 分を 32 サイクルの条件で PCR 反応を行った。なお、対照としての GAPDH の増幅には配列番号：8 および 9 のオリゴプライマーを用い、94°C で 1 分、58°C で 2 分、72°C で 3 分を 30 サイクルの条件で PCR 反応を行った。その結果、偶然にも、配列番号：6 および 7 に記載の WF-1 増幅用のオリゴプライマーを用いた検出において、精巣においてのみ特異的に発現する他の遺伝子の存在を見出した。この cDNA 断片を単離し、該 cDNA がコードする遺伝子を「Tesmin」と命名した（当初は、「Testin」と命名したが、その後「Tesmin」に改名した）。

〔実施例 2〕 マウス Tesmin cDNA のクローニングとシーケンス

この cDNA 断片の配列をジデオキシチェンターミネーション法により決定し、ABI377 自動配列塩基決定機で分析した。決定した配列につきデータベース検索を行った結果、この配列はデータベース内に相同性を見いだせない新規遺伝子であることが判明した。そこで、この cDNA 断片を ^{32}P 放射標識してプローブを調製し、これを用いてマウス精巣ライブラリーをスクリーニングを行った。その結果、約 1.7kb の長さを有するクローンが得られた。

さらに 5' 末端の配列を決定するために、5'-RACE を行った。5'-RACE においては、Tesmin 遺伝子に特異的な 3 つのアンチセンスプライマー、すなわち SP1 (配列番号：10)、SP2 (配列番号：11)、SP3 (配列番号：12) 及びマウス精巣由来 5'-Marathon RACE cDNA を用いた。5'-RACE 法は「Marathon-Ready™ cDNA kit (マウス精巣)」(Clontech 社製) のプロトコールに従って行った。これにより得られた Tesmin cDNA の全塩基配列を配列番号：1 (2241bp) および配列番号：2 (1861bp) に示す。これら 2 つの cDNA は転写時のスプライシングの相違により生じたスプライシングバリエーションであると考えられる。

これらの cDNA 配列につきデータベース検索を行った結果、データベース内に有意な相同性を有する配列は見いだせなかった。これら cDNA は 295 アミノ酸からなる同一のタンパク質 (pI-7.64) をコードし、タンパク質データベースにおいても有意に一致するものが見いだせなかった。

【実施例 3】 ヒト Tesmin cDNA のクローニングとシーケンス

マウス Tesmin プラスミド (pBluescript2 ベクターに Tesmin 遺伝子が挿入されたプラスミド) を SphI-SalI で切断した 1.7Kb の遺伝子断片をプローブとして、ヒト精巢の mRNA から調製した cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。ハイブリダイゼーション条件は「Rapid-hyb buffer」(Amersham LIFE SCIENCE 社製) を用い、60°C で 30 分プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、60°C で 2 時間保温することによりハイブリダイゼーションを行った。その後、2XSSC、0.01% SDS 中、室温で 20 分の洗浄を 3 回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS 中、37°C で 20 分の洗浄を 3 回、次いで、1xSSC、0.1% SDS 中、50°C で 20 分の洗浄を 2 回行った。

これにより得られたヒト Tesmin cDNA の塩基配列を配列番号 : 3 に示す。決定された塩基配列につきデータベース検索を行ったが、マウス cDNA と同様にデータベース内に相同性を有するものは見いだせなかった。また、得られたヒト cDNA はマウス Tesmin より 4 アミノ酸多い、299 アミノ酸からなるタンパク質 (pI-7.71) をコードし、タンパク質データベースにおいても有意に一致するものが見いだせなかった。しかしながら、BLAST によるアミノ酸配列の解析の結果、マウス、ヒトの Tesmin アミノ酸配列は部分的にはメタロチオネインファミリーの金属結合ドメインと非常に類似な構造を持つシステインリッチなタンパク質であることが判明した。

メタロチオネインは肝臓において、重金属で発現が誘導されその金属毒を中和する活性を持つことが知られているタンパク質である。しかし、精巢においてはメタロチオネインは金属で誘導されることなしに、常に遺伝子発現をして

いる。そのため、精巣において、メタロチオネインは金属結合をする以外になんらかの重要な役割をしている可能性が考えられてきた。最近の知見として、ジンクフィンガー転写因子でかつ、リセプタータンパク質であるエストロゲンリセプターとメタロチオネインは試験管内において金属の転移を行うことが示された(Cano-Gauci, D. and Sarkar, B. (1996) FEBS Lett 386(1):1-4)。そのため、メタロチオネインの金属結合部位が転写因子の制御に重要な役割をしているのではないかと考えられている。メタロチオネインファミリーの金属結合にはアミノ酸配列におけるシステイン構造を持つ配列「Cys-X-Cys-X-X-X-X-X-X-X-X-X-Cys-X-Cys (X は任意のアミノ酸を示す)」が重要な役割を担うとされている。

Tesmin においてもこのシステイン構造(マウスにおいては 157 から 171 位、ヒトにおいては 161 から 175 位)が保存されていた。しかし、これまでに知られているメタロチオネインファミリーは 60-70 アミノ酸残基からなる比較的低分子であるのに対し、Tesmin はこれらに比べてアミノ酸の鎖長が長かった(マウスは 295 アミノ酸残基、ヒトは 299 アミノ酸残基)。PROSITE によるドメインの検索の結果、マウス Tesmin においては N-ミリスチル化部位とカゼインキナーゼ 2 リン酸化部位を有していた。また、ヒト Tesmin においては cAMP と cGMP 依存性キナーゼリン酸化部位、プロテインキナーゼ C リン酸化部位、N-ミリスチル化部位、N-グリコシル化部位を有していた。その他に、cAMP や cGMP 依存性プロテインキナーゼリン酸化部位やプロテインキナーゼリン酸化部位を有していた。

BLOCKS によるドメイン検索において、マウスおよびヒト Tesmin において共通した部位が見出された。即ち、マウスおよびヒト Tesmin は、「High potential iron-sulfate protein」(マウスの 87 から 103 位、ヒトの 87 から 103 位)、「Adenodoxin family」(iron-sulfate binding region) (マウスの 177 から 194 位、ヒトの 181 から 198 位)、「Alpha-2-mavroglobulin family thiolester

region」(マウスの 243 から 252 位、ヒトの 247 から 256 位)、「Arrestins proteins」(マウスの 267 から 277 位、ヒトの 271 から 281 位)、「Ribosomal protein L14 proteins」(マウスの 5 から 26 位、ヒトの 5 から 26 位)、「Cooper amine oxidase topaquinone proteins」(マウスの 81 から 109 位、ヒトの 81 から 109 位)、「VFWC domain proteins」(マウスの 13 から 19 位、105 から 113 位、ヒトの 105 から 113 位)が確認された。また、PRINTS によって配列の特徴を解析したところ、マウス、ヒト Tesmin とともに「Rhodopsin-like GPCR superfamily signature」(マウスの 93 から 117 位、231 から 252 位、232 から 253 位、ヒトの 43 から 67 位、236 から 257 位)を有していた。

【実施例 4】 試験管内における転写翻訳

予想されるマウス Tesmin のオープンリーディングフレームを確認するためにインビトロトランスレーションを行った。具体的には、精巢からクローニングした cDNA pBluescript-Tesmin を、L-[35 S]メチオニンを添加したウサギ網状赤血球溶解物(Promega 社製)を用いて試験管内で 1 時間、転写、翻訳を行った。翻訳産物を SDS-PAGE 法で分離し、オートラジオグラフィーで検出した。その結果、ほぼ 32.5kDa の大きさのタンパク質が検出された(図 3)。この転写産物はマウス Tesmin 配列内の ORF として考えられるタンパク質の大きさとよく一致していた。

【実施例 5】 組み換え Tesmin の調製

マウス Tesmin cDNA のオープンリーディングフレームを、EcoRI 部位を持つセンス(配列番号:19)及びアンチセンス(配列番号:20)プライマーを用い、PCR 反応によって増幅した。PCR 反応で増幅したフラグメントを pGEM-T ベクターにクローン化し、その正確な配列を確認した。次いで、EcoRI-EcoRI を用いて切断し、最終的に GST 融合タンパク質を産生する pGEX-2TK ベクターにクローン化した。この pGEX2-TK 内にクローン化した Tesmin 産生物を大腸菌 JM109 に遺伝子導入し、IPTG 0.2mM を用いて 37°C で 3 時間誘導し、この大腸菌の溶解物

を SDS-PAGE 法で分離し、GST 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。その結果、GST 融合部分の分子量 26kDa を含んだ、58.5kDa のタンパク質が合成された (図 8 左)。組み換えタンパク質の大きさは、インビトロトランスレーションの結果と同様に分子の推定の大きさから予想されたものと同じであった。

[実施例 6] ノーザンブロット解析

マウス、ヒトの様々な組織の mRNA をレーンあたり 2 μ g のせたメンブレン (Clontech laboratories, Palo alto, CA) を購入し、ノーザンブロット解析を行った。プローブはマウス Tesmin プラスミド (pBluescript2 ベクターに Tesmin 遺伝子が挿入されたプラスミド) を SphI-SalI で切断した 1.7Kb の遺伝子断片をプローブとして用いた。ハイブリダイゼーション条件は「Rapid-hyb buffer」(Amersham LIFE SCIENCE 社製) を用い、68°C で 30 分プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68°C で 2 時間保温することによりハイブリダイゼーションを行った。その後、2XSSC、0.01% SDS 中、室温で 20 分の洗浄を 3 回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS 中、37°C で 20 分の洗浄を 3 回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS 中、50°C で 20 分の洗浄を 2 回行った。検出はオートラジオグラフィーによって行った。Tesmin 遺伝子の発現は RT-PCR 法による結果と同様に、精巣においてのみ検出され、マウスでは 2.4Kb と 2.0Kb の位置に (図 1)、ヒトでは 2.4Kb の位置にのみ遺伝子発現を確認した (図 2)。

[実施例 7] 生殖細胞分化への関与

アイソジェン (日本ジーン社製) を用いて、ICR ストレインマウスの生後 4 日、8 日、12 日、18 日、42 日目の精巣から、また 56 日目の W/W^v ストレインマウス (日本 SLC 社製 種類 WBB6F1-W/W^v / このマウスは増殖因子 S1 ファクターのレセプター c-kit 遺伝子を欠損したマウスで不妊マウスとして知られている。Chabot, B. et al. (1988) Nature 335(6185):88-9、Yoshinaga, K. et al. (1991) Development 113(2):689-99 参照) の精巣からトータル RNA を抽出し、R

NA を 65°C で変性させた後、リバーストランスクリプターゼ：スパースクリプト 2 (GIBCO/BRL 社製) を用い cDNA を作成した。Tesmin の反応は、配列番号：6 および 7 に記載のオリゴプライマーを用い、94°C で 1 分、58°C で 2 分、72°C で 3 分を 35 サイクルの条件で行った。また対照としての GAPDH の反応は配列番号：7 および 8 に記載のオリゴプライマーを用い、94°C で 1 分、58°C で 2 分、72°C で 3 分を 30 サイクルの条件で、MEG 1 の反応には配列番号：13 および 14 のオリゴプライマーを用い、94°C で 1 分、58°C で 2 分、72°C で 3 分を 35 サイクルの条件で、ssh2B の反応は配列番号：15 および 16 のオリゴプライマーを用い、94°C で 1 分、58°C で 2 分、72°C で 3 分を 35 サイクルの条件で PCR 反応を行った。なお、マーカーとして用いた MEG1 は精原細胞から精母細胞への分裂時期に発現し (Don, J. and Wolgemuth, D.J. (1992) Aug; 3(8):495-505)、また、ssh2B は精子形成時に発現するとして知られている (Unni, E. et al. (1995) Biol Reprod, Oct; 53(4):820-826)。

PCR 解析の結果、Tesmin 遺伝子は生後 8 日目までは発現せず、その後 12 日目でやや弱く、18 日目以降安定的な発現パターンを見せた (図 4)。Tesmin 遺伝子の精巣における発現は MEG1 と同様の発現パターンを示した。このため Tesmin が、MEG と同時期に発現制御されていることが判明した。

また、W/Wv マウスにおいて Tesmin の発現を調べたところ、W/Wv マウスにおいては Tesmin 遺伝子が発現していないことが判明した。W/Wv マウスは不妊マウスとして知られており、Tesmin 遺伝子と不妊との関係が強く示された (図 4)。

[実施例 8] インシチュウ・ハイブリダイゼーション

マウス Tesmin プラスミド (pBluescript2 ベクターに Tesmin 遺伝子が挿入されたプラスミド) から T7、T3 ポリメラーゼとジゴキシゲニン-dUTP を用いて標識した RNA プローブを作成した。このプローブを 50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、2 x SSC を含む溶液中でスライスしたマウスの精巣組織とハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたスライドガラスをアルカリホスファ

ターゼを結合した抗ジゴキシゲニン抗体中でインキュベートし発色基質 NBT/BCIP を用いてハイブリダイゼーションに特異的なシグナルを検出した。その結果、Tesmin は、精巣においても特に、精母細胞の時期において非常に特異的に発現していることが確認された (図 5)。

【実施例 9】 染色体上の配置

マウス Tesmin に特異的なセンスプライマー (配列番号 : 6) 及びアンチセンスプライマー (配列番号 : 7) を用いた P1 バクテリオファージゲノムライブラリーの PCR スクリーニングにより、マウスの P1 ゲノムライブラリーを得た。また、ヒト Tesmin に特異的なセンスプライマー (配列番号 : 17) 及びアンチセンスプライマー (配列番号 : 18) を用い、マウスと同様のスクリーニング法により、ヒトの P1 ゲノムライブラリーを得た。単離した P1 クローンは蛍光インシチューハイブリダイゼーション (FISH) により染色体における局在性を調べるために使用した。マウス、ヒトの P1 クローン由来の DNA をニックトランスレーションによりジゴキシゲニン-dUTP を用いて標識し、そのプローブを、50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、2 x SSC を含む溶液中でマウス、ヒトの初期繊維芽細胞由来の分裂中期染色体とハイブリダイズさせた。ハイブリダイズさせたスライドガラスを蛍光標識した抗ジゴキシゲニン抗体中でインキュベートし、さらに 4'6' ジアミノ-2-フェノールインドール(DAPI)を用いたカウンター染色によりハイブリダイゼーションに特異的なシグナルを検出した。

その結果、マウス、ヒト Tesmin に特異的なプローブはクローニングされたそれぞれの P1 クローンにハイブリダイズしたため、これらの P1 クローンは Tesmin 遺伝子をコードしていることが判明した。また、これらの P1 クローンをプローブとして DAPI 染色を行った結果、マウスでは 19 番 B 染色体がヒトでは 11 番染色体の q13.2 領域が、特異的に標識された。以上のことから、Tesmin はマウス 19 番 B 染色体上 (図 6) に、ヒトでは 11 番 q13.2 染色体上 (図 7) に存在することが確認された。また、この結果をもとに Tesmin とマウスの遺伝病

との関わりをジャクソンラボラトリーのデータベースを用いて調べたところ、Tesmin の存在する 19 番 B の位置の変異がマウスの不妊を引き起こすという研究が報告されている (Evans, EP. (1977) Mouse News Letter, 17)。この事実は、Tesmin の変異がマウスの不妊症を引き起こしている可能性を示している。

【実施例 10】 細胞内での局在

EcoRI 部位を持つセンス (配列番号: 19) 及びアンチセンス (配列番号: 20) プライマーを用い Tesmin cDNA の全てのオープンリーディングフレームを、また、EcoRI 部位を持つセンス (配列番号: 19) 及び SalI 部位を持つアンチセンス (配列番号: 21) プライマーを用い Tesmin cDNA のオープンリーディングフレームから 70 アミノ酸をディレーションするように設計された遺伝子を作製した。これらの遺伝子を制限酵素処理後、pEGFC1 ベクター (Clontech 社製) における GFP ORF の C 末端領域に挿入した。GFP-Tesmin 融合タンパク質をコードするこのプラスミドをカバーガラス上で生育している COS1 細胞に Tfx-50 (Promega 社製) を用いて導入した。カバーガラスメタノール/アセトン (1:1) で固定し、PBS で 3 回洗浄した。細胞はエピフルオレッセンス光学系のオリンパス BH-2 顕微鏡で観察した。その結果、Tesmin 全配列を融合させたタンパク質は細胞質内に局在していたが、Tesmin の一部の配列を欠損させたものは核内に移行していることが明らかとなった (図 8)。

【実施例 11】 Tesmin タンパク質に結合する特異的抗体の作製

Tesmin の遺伝子配列から予測される 18 アミノ酸残基に対するペプチド抗体を作製した。具体的には、ペプチド合成機で 18 個のアミノ酸配列 (配列番号: 22) を作製し、この得られたペプチドに KLH を架橋試薬で共有結合させた。次に、HPLC でこのペプチドを精製後、ウサギに免疫し、4 回に分けて段階的に血清を抽出し、最終的には全採決を行った。この血清をプロテイン A カラムにより精製しポリクローナル抗体を調製した。GST を融合させた Tesmin タンパク質を SDS-PAGE 法を用いたゲル上で分離し、ウエスタンブロッティング法によっ

て検出することによって、この抗 Tesmin ポリクローナル抗体が Tesmin タンパク質を認識することを確認した (図 9)。

ウェスタンブロッティングは、Tesmin cDNA を導入した大腸菌にイソプロピル- β -D-チオガラクトシド (IPTG) を添加して組換えタンパク質の発現を誘導した後、その細胞溶解液に対して SDS-PAGE を行ない検出した (図 9 の IPTG+)。また、IPTG を添加しない大腸菌の細胞溶解液を用いた検出も行なった (図 9 の IPTG-)。

産業上の利用の可能性

本発明により、金属結合部位を有し、精巣細胞の分化に密接に関与する Tesmin タンパク質およびその遺伝子が提供された。Tesmin タンパク質およびその遺伝子は、精子形成の分化に関与し、さらには不妊マウスにおいて遺伝子発現がなく、また遺伝病である不妊マウスの原因遺伝子である可能性が考えられる。そのため、例えば、Tesmin 遺伝子を体内もしくは細胞に導入することによって、不妊病の遺伝子治療への応用が期待される。また、Tesmin は精巣のみに発現し、また精巣の中でも限定された時期にのみ発現している遺伝子であるため、精巣細胞の分化時期を決定するための検査薬としての応用も考えられる。さらには、Tesmin はメタロチオネインと同様の金属結合部位を持つと考えられるため、メタロチオネインと同様の金属毒解毒薬としての応用も考えられる。また、精巣における金属との結合の意義を解析するような応用研究への利用も期待される。

請求の範囲

1. 配列番号：4または5に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。
2. 配列番号：4または5に記載のアミノ酸配列において1または複数のアミノ酸が置換、欠失、および／または付加したアミノ酸配列からなり、請求項1に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質。
3. 配列番号：1または3に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、請求項1に記載のタンパク質と機能的に同等なタンパク質。
4. 請求項1から3のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA。
5. 請求項4に記載のDNAを含むベクター。
6. 請求項4に記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。
7. 請求項6に記載の形質転換体を培養し、該形質転換体またはその培養上清から発現させたタンパク質を回収する工程を含む、請求項1から3のいずれかに記載のタンパク質を製造する方法。
8. 請求項1から3のいずれかに記載のタンパク質に結合する抗体。
9. 配列番号：1から3のいずれかに記載の塩基配列からなるDNAに特異的にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するDNA。

1/9

図 1

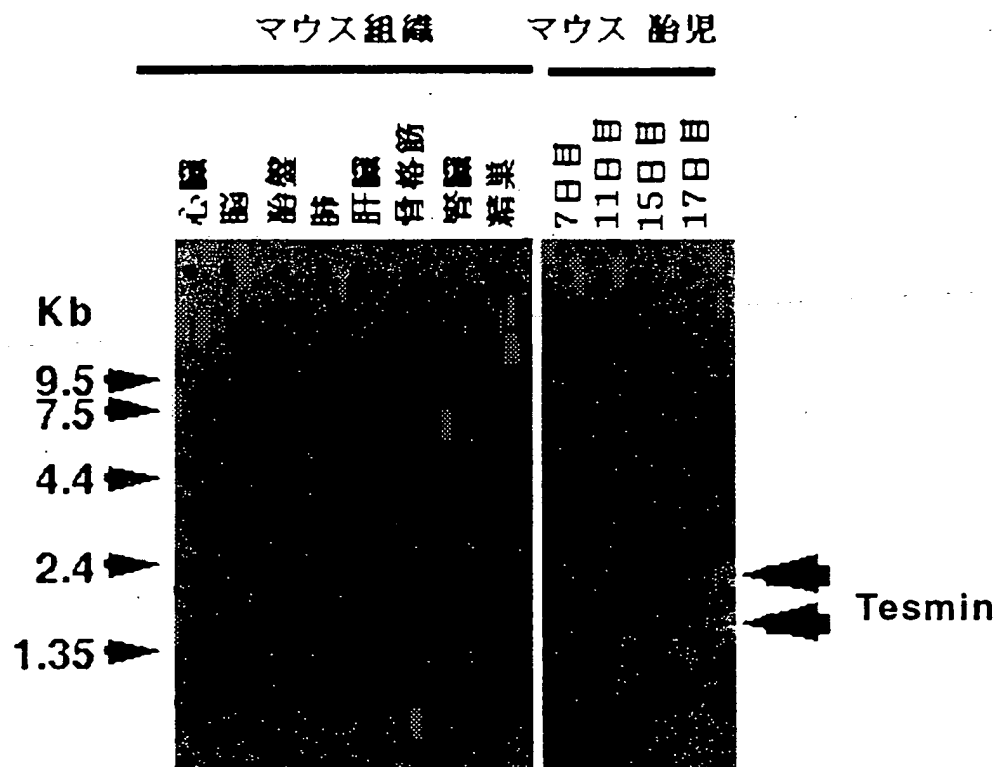


図 2



心臓
脳
胎盤
肺
肝臓
骨格筋
腎臓
脾臓
胸腺
前立腺
精巣
卵巣
小腸
結腸
白血球

図 3

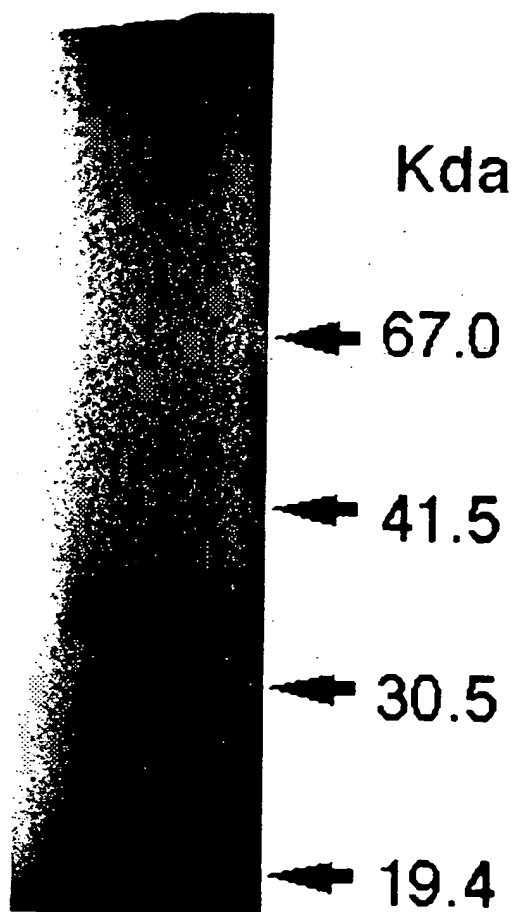


図 4

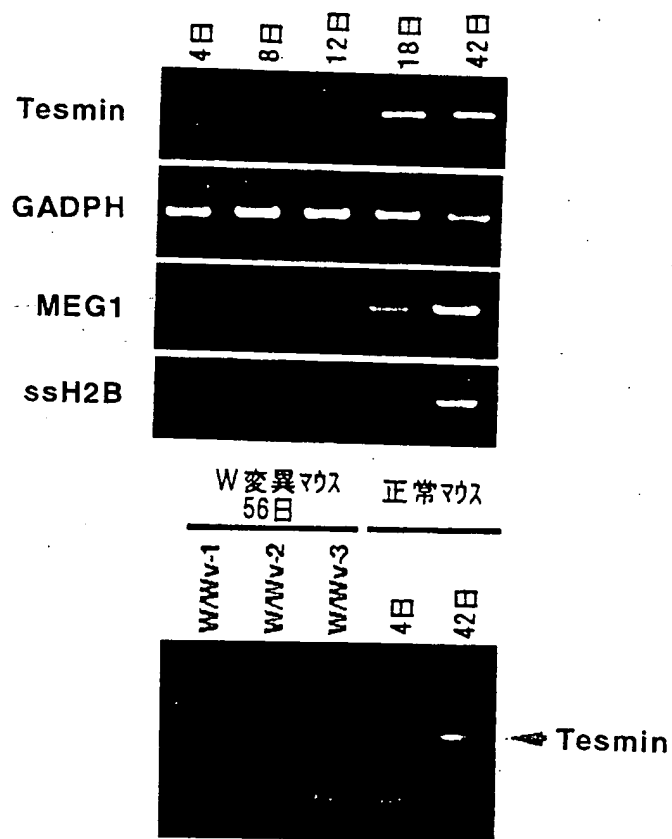
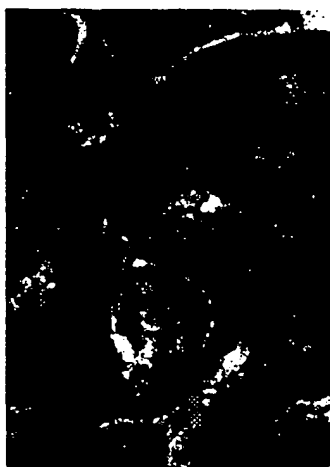


図 5

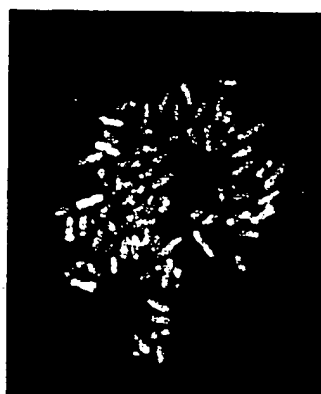


Tesmin-アンチセンスプライマー

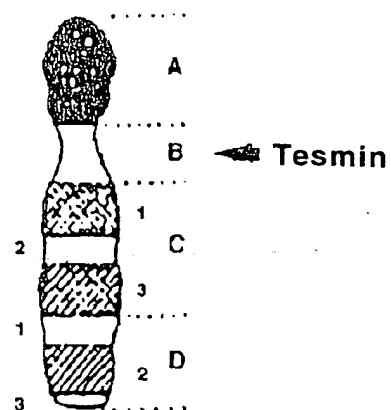


Tesmin-センスプライマー

☒ 6

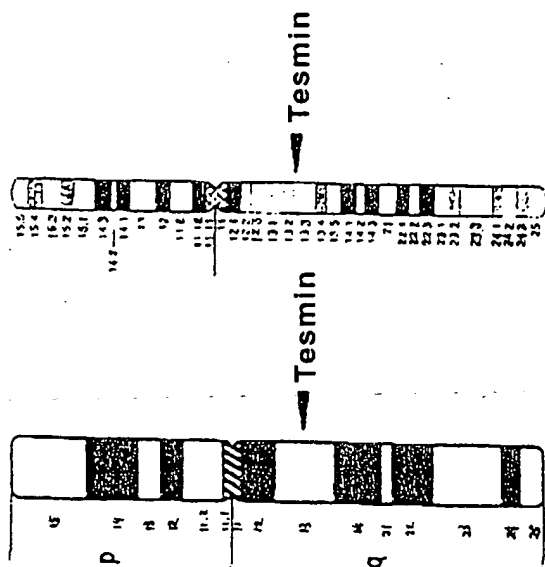


19



7/9

7



11

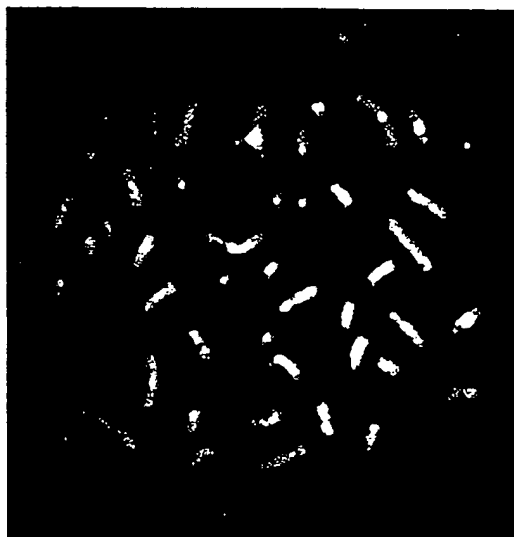
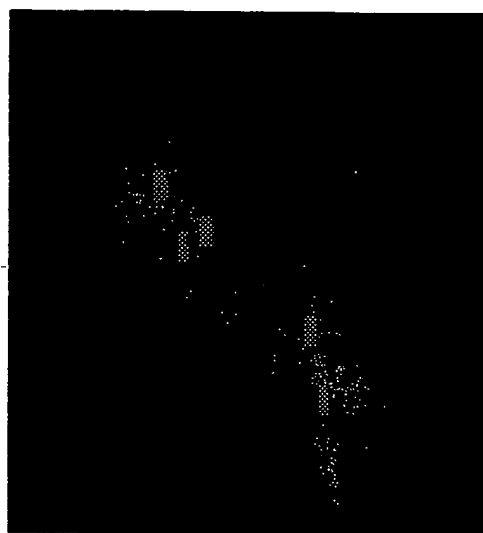
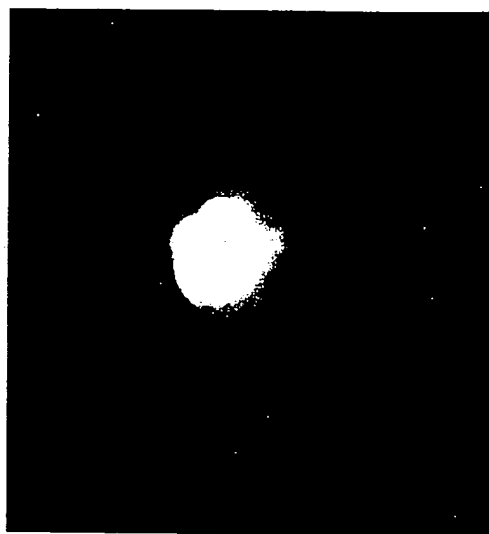


図 8

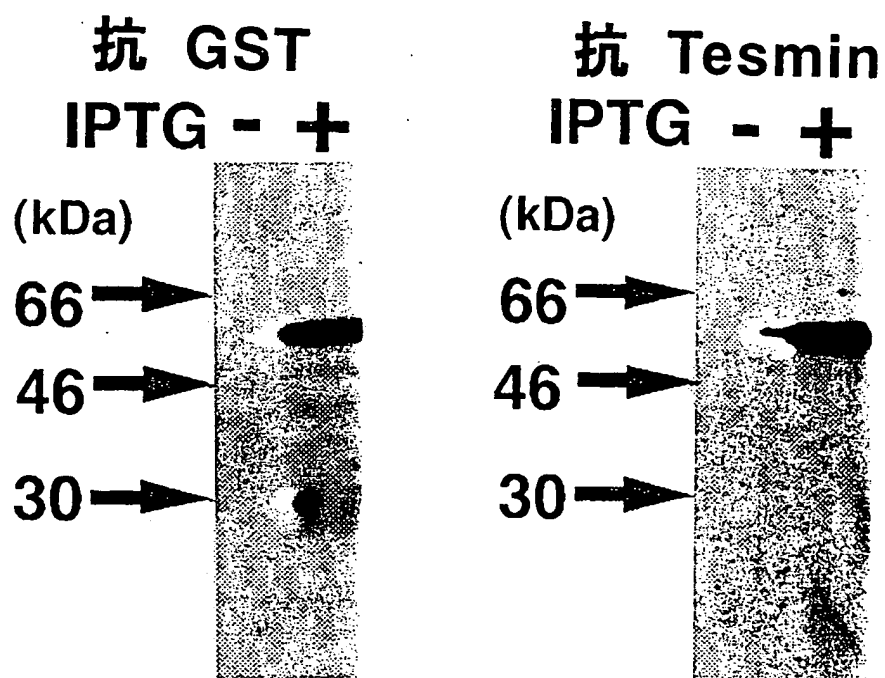


pEGFC1-Tesmin 完全



pEGFC1-Tesmin 欠失

图 9



配列表

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

株式会社中外分子医学研究所

<120> Testis specific factor

精巢特異発現性分化制御因子

<130> C2-003PCT

<140>

<141>

<150> JP10-219856

<151> 1998-7-17

<160> 22

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (651)..(1535)

<400> 1

tatcctgtgg gttggccccg ggcagcaggc tctcagcagg ctcaggcacc acaaggata 60

cacagtgtgt gttcctggcc tgttggactt gtgactccac ccacctccgc cccagcaggg 120

ctagggatag aaccagggc cttttgcgtg ttctgcagat agtcttcage ctggtagttt 180

ggggttggct gggagatttt tttttcttca caccaaagac ttccattatt gaggattttt 240

tcagttgatg atctcccccc tctgtaagat aaggacagt tctttaaac tatgtagagt 300

tttgatgaat tctgcttctc aaccatattg ctaagctata tagcaattcc ttgaaattgc 360

tatataactt aggagaacct ctgattctcc tgcctctaca tcttgagtgc taggtgtaca 420

gggggaaatc attttgggta gactccgatg aactactgcc aggttcccaa ggcagcaagc 480

aagcaagaaa aagtgttgaa atcaaagaag caggtggtag tgtgccaggc ggcagccctg 540

aagacgcagc tticcaggcc cctctggctc aggaatcctg ttgcaagttc ccatcatccc 600

aggaggcaga ggaggcctcc agctgccctc ggaagaaaga ctccagcccc atg gtg 656

Met Val

1

att tgt cag ctg aaa gga ggc gcc cag atg ctc tgc ata gac aac tgt 704
Ile Cys Gln Leu Lys Gly Gly Ala Gln Met Leu Cys Ile Asp Asn Cys
5 10 15

ggc gcg agg gag ctc aaa gcg ctc cat ctg ctt cct cag tac gat gac 752
Gly Ala Arg Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Leu Pro Gln Tyr Asp Asp
20 25 30

cag agc agt ttc cct cag tca gag ctc cct aag cca atg aca act tta 800
Gln Ser Ser Phe Pro Gln Ser Glu Leu Pro Lys Pro Met Thr Thr Leu
35 40 45 50

gtg gga aga ctt ctg cca gta cca gcg aag tta aat ctc atc aca cag 848
Val Gly Arg Leu Leu Pro Val Pro Ala Lys Leu Asn Leu Ile Thr Gln
55 60 65

gtt gat aat gga gct ctc cca tca gct gtc aat ggg gct gcc ttt ccc 896
Val Asp Asn Gly Ala Leu Pro Ser Ala Val Asn Gly Ala Ala Phe Pro
70 75 80

tct gga cct gct ctg caa ggg cca ccc aaa ata act ctg tct ggg tac 944
Ser Gly Pro Ala Leu Gln Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ser Gly Tyr
85 90 95

tgt gac tgc ttc tcc agc ggg gac ttc tgc aac agc tgc agc tgc aac 992

Cys Asp Cys Phe Ser Ser Gly Asp Phe Cys Asn Ser Cys Ser Cys Asn

100

105

110

aac ctg cgc cat gag ctc gag cgc ttc aaa gcc ata aag gcg tgt ctt 1040

Asn Leu Arg His Glu Leu Glu Arg Phe Lys Ala Ile Lys Ala Cys Leu

115

120

125

130

gat aga aat cct gaa gct ttc caa cca aaa atg ggg aaa ggc cgt ctg 1088

Asp Arg Asn Pro Glu Ala Phe Gln Pro Lys Met Gly Lys Gly Arg Leu

135

140

145

gga gct gct aaa ctt cga cac agc aaa ggg tgc aac tgt aag cgc tca 1136

Gly Ala Ala Lys Leu Arg His Ser Lys Gly Cys Asn Cys Lys Arg Ser

150

155

160

ggc tgc ctg aag aac tac tgt gag tgc tat gag gcc aaa atc atg tgt 1184

Gly Cys Leu Lys Asn Tyr Cys Glu Cys Tyr Glu Ala Lys Ile Met Cys

165

170

175

tct tcc att tgc aaa tgc att gct tgc aaa aac tat gaa gaa agt cca 1232

Ser Ser Ile Cys Lys Cys Ile Ala Cys Lys Asn Tyr Glu Glu Ser Pro

180

185

190

gaa cga aaa atg ctg atg agc aca ccc cac tac atg gag cct ggg gac 1280

Glu Arg Lys Met Leu Met Ser Thr Pro His Tyr Met Glu Pro Gly Asp

195	200	205	210
ttt gag agc agc cat tat ttg tcc cca gcc aag ttc tca gga cct cca 1328			
Phe Glu Ser Ser His Tyr Leu Ser Pro Ala Lys Phe Ser Gly Pro Pro			
215	220	225	
aaa ctg aga aaa aat agg cag gcc ttc tcc tgt atc tcc tgg gaa gta 1376			
Lys Leu Arg Lys Asn Arg Gln Ala Phe Ser Cys Ile Ser Trp Glu Val			
230	235	240	
gtg gag gcc aca tgt gcc tgc ctg ctg gcc cag ggt gag gaa gca gag 1424			
Val Glu Ala Thr Cys Ala Cys Leu Leu Ala Gln Gly Glu Glu Ala Glu			
245	250	255	
cag gag cac tgt tcc cca agc ttg gct gag cag atg atc ctg gag gag 1472			
Gln Glu His Cys Ser Pro Ser Leu Ala Glu Gln Met Ile Leu Glu Glu			
260	265	270	
ttt gga agg tgc ctg tgc cag att ctc cac atc gag ttc aag tcc aag 1520			
Phe Gly Arg Cys Leu Ser Gln Ile Leu His Ile Glu Phe Lys Ser Lys			
275	280	285	290
ggg ctg aaa att gag tagcgtgcaa gctggtaaag gggaatgcct gtggcaagcc 1575			
Gly Leu Lys Ile Glu			
295			

tcagccctgg gaatctgcac cgaggaagct ggtgcccagg gaggagcaga ggccgcgcat 1635

catggccagg tcagctgtga ggtctgagtg atctgcatgg tactggccag cctactcaag 1695

gtatcctaaa gtgcaagcag gcagagccac cctggggatg gacactggcc ctctgtccc 1755

tggggaggcc ctctggggac tccctgccct gcataaaaag agggtgattt tctacttggt 1815

gttatgtgtt tgctttcaaa ttgcttagta gtacctccat tcaagttatt atgagccagc 1875

ctcaagttag agagctaggc tcttcttcag gtggactctg cccaaatcac atacaagtca 1935

ggtggccatc aggggttttt ccaggccagg cctgtgacag gagatatggg aggggggtcg 1995

ggttagagct gggtttggtt ggattttttg cgtttttttc ttctgtatt tctgcttgaa 2055

gtgagaaaac ttgtctcctg tccaaccttt tctccataat tactgctgca cggtcgcctg 2115

ctgaccagtc acagtgacct cagacaccag aaggtgaggt ggcttattat gccacactt 2175

tgtgttttgt tgtgagaata aacctttcca gactcccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2235

aaaaaa 2241

<210> 2

<211> 1861

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (271)..(1155)

<400> 2

ccagacgacg ccgctccgcc tccgcctac agcgtgcacg tggtatcgte gttacttccc 60

ggtgctcgcg ggcccgcgct gttgccgcta agcgcaggag tgcgcgtgat cccagttgaa 120

atcaaagaag caggtggtag tgtgccaggc ggcagccctg aagacgcage tttccaggcc 180

cctctggctc aggaatcctg ttgcaagttc ccatcatccc aggaggcaga ggaggcctcc 240

agctgcctc ggaagaaaga ctccagcccc atg gtg att tgt cag ctg aaa gga 294

Met Val Ile Cys Gln Leu Lys Gly

1

5

ggc gcc cag atg ctc tgc ata gac aac tgt ggc gcg agg gag ctc aaa 342

Gly Ala Gln Met Leu Cys Ile Asp Asn Cys Gly Ala Arg Glu Leu Lys

10

15

20

gcg ctc cat ctg ctt cct cag tac gat gac cag agc agt ttc cct cag 390

Ala Leu His Leu Leu Pro Gln Tyr Asp Asp Gln Ser Ser Phe Pro Gln

25	30	35	40
tca gag ctc cct aag cca atg aca act tta gtg gga aga ctt ctg cca 438			
Ser Glu Leu Pro Lys Pro Met Thr Thr Leu Val Gly Arg Leu Leu Pro			
45	50	55	
gta cca gcg aag tta aat ctc atc aca cag gtt gat aat gga gct ctc 486			
Val Pro Ala Lys Leu Asn Leu Ile Thr Gln Val Asp Asn Gly Ala Leu			
60	65	70	
cca tca gct gtc aat ggg gct gcc ttt ccc tct gga cct gct ctg caa 534			
Pro Ser Ala Val Asn Gly Ala Ala Phe Pro Ser Gly Pro Ala Leu Gln			
75	80	85	
ggg cca ccc aaa ata act ctg tct ggg tac tgt gac tgc ttc tcc agc 582			
Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ser Gly Tyr Cys Asp Cys Phe Ser Ser			
90	95	100	
ggg gac ttc tgc aac agc tgc agc tgc aac aac ctg cgc cat gag ctc 630			
Gly Asp Phe Cys Asn Ser Cys Ser Cys Asn Asn Leu Arg His Glu Leu			
105	110	115	120
gag cgc ttc aaa gcc ata aag gcg tgt ctt gat aga aat cct gaa gct 678			
Glu Arg Phe Lys Ala Ile Lys Ala Cys Leu Asp Arg Asn Pro Glu Ala			
125	130	135	

ttc caa cca aaa atg ggg aaa ggc cgt ctg gga gct gct aaa ctt cga 726

Phe Gln Pro Lys Met Gly Lys Gly Arg Leu Gly Ala Ala Lys Leu Arg

140

145

150

cac agc aaa ggg tgc aac tgt aag cgc tca ggc tgc ctg aag aac tac 774

His Ser Lys Gly Cys Asn Cys Lys Arg Ser Gly Cys Leu Lys Asn Tyr

155

160

165

tgt gag tgc tat gag gcc aaa atc atg tgt tct tcc att tgc aaa tgc 822

Cys Glu Cys Tyr Glu Ala Lys Ile Met Cys Ser Ser Ile Cys Lys Cys

170

175

180

att gct tgc aaa aac tat gaa gaa agt cca gaa cga aaa atg ctg atg 870

Ile Ala Cys Lys Asn Tyr Glu Glu Ser Pro Glu Arg Lys Met Leu Met

185

190

195

200

agc aca ccc cac tac atg gag cct ggg gac ttt gag agc agc cat tat 918

Ser Thr Pro His Tyr Met Glu Pro Gly Asp Phe Glu Ser Ser His Tyr

205

210

215

ttg tcc cca gcc aag ttc tca gga cct cca aaa ctg aga aaa aat agg 966

Leu Ser Pro Ala Lys Phe Ser Gly Pro Pro Lys Leu Arg Lys Asn Arg

220

225

230

cag gcc ttc tcc tgt atc tcc tgg gaa gta gtg gag gcc aca tgt gcc 1014

Gln Ala Phe Ser Cys Ile Ser Trp Glu Val Val Glu Ala Thr Cys Ala

235 240 245

tgc ctg ctg gcc cag ggt gag gaa gca gag cag gag cac tgt tcc cca 1062
Cys Leu Leu Ala Gln Gly Glu Glu Ala Glu Gln Glu His Cys Ser Pro

250 255 260

agc ttg gct gag cag atg atc ctg gag gag ttt gga agg tgc ctg tcg 1110
Ser Leu Ala Glu Gln Met Ile Leu Glu Glu Phe Gly Arg Cys Leu Ser

265 270 275 280

cag att ctc cac atc gag ttc aag tcc aag ggg ctg aaa att gag 1155
Gln Ile Leu His Ile Glu Phe Lys Ser Lys Gly Leu Lys Ile Glu

285 290 295

tagcgtgcaa gctggtaaag gggaatgcct gtggcaagcc tcagccctgg gaatctgcac 1215

cgaggaagct ggtgccagcagg gaggagcaga ggccgcgcac catggccagg tcagctgtga 1275

ggtctgagtg atctgcatgg tactggccag cctactcaag gtatcctaaa gtgcaagcag 1335

gcagagccac cctggggatg gacactggcc ctctgtccc tggggaggcc ctctggggac 1395

tccctgcct gcataaaaag agggtgattt tctacttggt gttatgtgtt tgctttcaaa 1455

ttgcttagta gtacctccat tcaagttatt atgagccagc ctcaagttag agagctaggc 1515

tcttcttcag gtggactctg cccaaatcac atacaagtca ggtggccatc aggggttttt 1575

ccaggccagg cctgtgacag gagatatggg aggggggtcg ggtagagct gggtttgttt 1635

ggattttttg cgtttttttc ttctgtatt tctgcttgaa gtgagaaaac ttgtctcctg 1695

tccaaccttt tctccataat tactgctgca cggtcgcctg ctgaccagtc acagtgacct 1755

cagacaccag aaggtgaggt ggcttattat gccacactt tgtgttttgt tgtgagaata 1815

aacctttcca gactcccaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1861

<210> 3

<211> 2134

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (407)..(1303)

<400> 3

aattcgggggt caaggcgaag ctgcgggggg gcgacagcga cggcggggag ctctcgggg 60

agtaccccggt gatccagag ctacgcgcgc tggaggacgt cgcgctcctg caggccccgc 120

agccgccccg ctgcaacgtg cacttctgt cctcgctgct acccgcgcac cgcagccccg 180

gggtgttttg cccctggggc gcctgggtcc tgcgaaggag cctcccaccc gggcgtccgc 240

atgatcccag ttgaaatcaa ggtaagcagg tggctactact acaagtaata atccggaaga 300

agcaactttg cagaatcttc ttgctcagga atcctgttgc aagttcccat ggtcccagga 360

actagaggat gcctcctgct gttctcttaa gaaagattcc aaccca atg gtg ata 415

Met Val Ile

1

tgc caa ttg aaa ggg ggc aca caa atg cta tgt ata gac aat tct aga 463

Cys Gln Leu Lys Gly Gly Thr Gln Met Leu Cys Ile Asp Asn Ser Arg

5

10

15

aca aga gaa cta aaa gca ctc cat ttg gtt cct cag tat caa gat caa 511

Thr Arg Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Val Pro Gln Tyr Gln Asp Gln

20

25

30

35

aat aat tat cta cag tca gat gtc cct aaa cca atg act gct tta gta 559

Asn Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Val Pro Lys Pro Met Thr Ala Leu Val

40

45

50

ggg aga ttt ttg cca gca tca aca aaa tta aat ctc att aca caa caa 607

Gly Arg Phe Leu Pro Ala Ser Thr Lys Leu Asn Leu Ile Thr Gln Gln

55	60	65
ctt gag gga gcc tta cca tcg gta gtc aac ggg tct gct ttc ccc tcg 655		
Leu Glu Gly Ala Leu Pro Ser Val Val Asn Gly Ser Ala Phe Pro Ser		
70	75	80
gga tca act ctt cca gga cca cca aaa ata act ttg gct ggg tac tgt 703		
Gly Ser Thr Leu Pro Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ala Gly Tyr Cys		
85	90	95
gac tgc ttt gcc agt ggg gac ttt tgc aac aac tgc aat tgt aat aat 751		
Asp Cys Phe Ala Ser Gly Asp Phe Cys Asn Asn Cys Asn Cys Asn Asn		
100	105	110 115
tgt tgc aac aac ttg cat cat gat att gaa cgg ttt aaa gcc att aag 799		
Cys Cys Asn Asn Leu His His Asp Ile Glu Arg Phe Lys Ala Ile Lys		
120	125	130
gca tgt ctt ggt aga aat cca gaa gct ttc cag cca aaa att ggg aag 847		
Ala Cys Leu Gly Arg Asn Pro Glu Ala Phe Gln Pro Lys Ile Gly Lys		
135	140	145
ggc caa ttg ggc aat gtc aag ccc cag cac aac aaa ggg tgc aac tgc 895		
Gly Gln Leu Gly Asn Val Lys Pro Gln His Asn Lys Gly Cys Asn Cys		
150	155	160

agg agg tca ggc tgc ctg aag aat tac tgc gag tgc tat gag gcc caa 943

Arg Arg Ser Gly Cys Leu Lys Asn Tyr Cys Glu Cys Tyr Glu Ala Gln

165

170

175

att atg tgt tct tct att tgc aaa tgc att ggt tgc aaa aat tat gaa 991

Ile Met Cys Ser Ser Ile Cys Lys Cys Ile Gly Cys Lys Asn Tyr Glu

180

185

190

195

gaa agc cca gaa cga aag aca cta atg agc atg cca aac tac atg cag 1039

Glu Ser Pro Glu Arg Lys Thr Leu Met Ser Met Pro Asn Tyr Met Gln

200

205

210

act gga ggt ttg gaa ggc agc cat tac ctg cca cca acg aaa ttt tca 1087

Thr Gly Gly Leu Glu Gly Ser His Tyr Leu Pro Pro Thr Lys Phe Ser

215

220

225

gga ctt cca aga ttc agt cac gat agg cgg cct tcc tca tgc atc tcc 1135

Gly Leu Pro Arg Phe Ser His Asp Arg Arg Pro Ser Ser Cys Ile Ser

230

235

240

tgg gag gtg gtg gag gcc aca tgc gcc tgc ctg ctt gct cag gga gaa 1183

Trp Glu Val Val Glu Ala Thr Cys Ala Cys Leu Leu Ala Gln Gly Glu

245

250

255

gag gcc gag aaa gaa cac tgc tcc aag tgc ctg gca gag cag atg atc 1231

Glu Ala Glu Lys Glu His Cys Ser Lys Cys Leu Ala Glu Gln Met Ile

260	265	270	275
ctg gag gaa ttt gga agg tgc tta tca cag att ctc cac act gag ttt 1279			
Leu Glu Glu Phe Gly Arg Cys Leu Ser Gln Ile Leu His Thr Glu Phe			
280	285	290	
aaa tct aag gga ttg aaa atg gag tagagtataa agtgtgaatg catgttgatt 1333			
Lys Ser Lys Gly Leu Lys Met Glu			
295			
ttgtcttagt ctagaaatct ctagtttaga aaggatgttt aggggaacat gaggctggct 1393			
ctgcagcaac aaccaggctc cctgcatcc ctgggccag ggagtttact cagagctctc 1453			
tgaagatgtg gcaacccatg ccccttttc tgaggaggtg catggcctga gcattgtttg 1513			
tctggcccag aggagagagc ttgggttccc atagtcctgg gagagtgtct gcagggcggc 1573			
ggagggcaga gcaggccctg cggagagctc actctggctg actcttcctc tcagagaatg 1633			
ttgctctgga ggctgctctg catgaaaacc ctaatggttt cttgtttgtt tttcaaatta 1693			
tttagaaata agttctcgg atgggctgtt gtgataccac ttaaaatctc tagagaacta 1753			
ctgaacacct aaagattttc tgtagcgtag atatttcccc agagacacgc gaactgtcag 1813			

tctttcctaa ggccccggg agacgcaggc aatggggcct cgcaggccag gcttgcacca 1873

gcatgtcttg agttagagga cttaaaatta tccagtttct tctgtgtttc tacttgaatt 1933

gtggaaaagc tctattatcc aattaacttc tccataatta ttgttgtaat attattattg 1993

tttgtaaaac atggttcaca taactagctt gtggaaacca gcaggtaaaa tgaattctta 2053

agttgacgct ttgtgttctg ttgtaaagca aagatgaata aaaatttcca atgtcgaaaa 2113

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2134

<210> 4

<211> 295

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Val Ile Cys Gln Leu Lys Gly Gly Ala Gln Met Leu Cys Ile Asp

1 5 10 15

Asn Cys Gly Ala Arg Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Leu Pro Gln Tyr

20 25 30

Asp Asp Gln Ser Ser Phe Pro Gln Ser Glu Leu Pro Lys Pro Met Thr

35 40 45

Thr Leu Val Gly Arg Leu Leu Pro Val Pro Ala Lys Leu Asn Leu Ile

50

55

60

Thr Gln Val Asp Asn Gly Ala Leu Pro Ser Ala Val Asn Gly Ala Ala

65

70

75

80

Phe Pro Ser Gly Pro Ala Leu Gln Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ser

85

90

95

Gly Tyr Cys Asp Cys Phe Ser Ser Gly Asp Phe Cys Asn Ser Cys Ser

100

105

110

Cys Asn Asn Leu Arg His Glu Leu Glu Arg Phe Lys Ala Ile Lys Ala

115

120

125

Cys Leu Asp Arg Asn Pro Glu Ala Phe Gln Pro Lys Met Gly Lys Gly

130

135

140

Arg Leu Gly Ala Ala Lys Leu Arg His Ser Lys Gly Cys Asn Cys Lys

145

150

155

160

Arg Ser Gly Cys Leu Lys Asn Tyr Cys Glu Cys Tyr Glu Ala Lys Ile

165

170

175

Met Cys Ser Ser Ile Cys Lys Cys Ile Ala Cys Lys Asn Tyr Glu Glu

180	185	190
Ser Pro Glu Arg Lys Met Leu Met Ser Thr Pro His Tyr Met Glu Pro		
195	200	205
Gly Asp Phe Glu Ser Ser His Tyr Leu Ser Pro Ala Lys Phe Ser Gly		
210	215	220
Pro Pro Lys Leu Arg Lys Asn Arg Gln Ala Phe Ser Cys Ile Ser Trp		
225	230	235 240
Glu Val Val Glu Ala Thr Cys Ala Cys Leu Leu Ala Gln Gly Glu Glu		
245	250	255
Ala Glu Gln Glu His Cys Ser Pro Ser Leu Ala Glu Gln Met Ile Leu		
260	265	270
Glu Glu Phe Gly Arg Cys Leu Ser Gln Ile Leu His Ile Glu Phe Lys		
275	280	285
Ser Lys Gly Leu Lys Ile Glu		
290	295	

<210> 5

<211> 299

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Val Ile Cys Gln Leu Lys Gly Gly Thr Gln Met Leu Cys Ile Asp

1 5 10 15

Asn Ser Arg Thr Arg Glu Leu Lys Ala Leu His Leu Val Pro Gln Tyr

20 25 30

Gln Asp Gln Asn Asn Tyr Leu Gln Ser Asp Val Pro Lys Pro Met Thr

35 40 45

Ala Leu Val Gly Arg Phe Leu Pro Ala Ser Thr Lys Leu Asn Leu Ile

50 55 60

Thr Gln Gln Leu Glu Gly Ala Leu Pro Ser Val Val Asn Gly Ser Ala

65 70 75 80

Phe Pro Ser Gly Ser Thr Leu Pro Gly Pro Pro Lys Ile Thr Leu Ala

85 90 95

Gly Tyr Cys Asp Cys Phe Ala Ser Gly Asp Phe Cys Asn Asn Cys Asn

100 105 110

Cys Asn Asn Cys Cys Asn Asn Leu His His Asp Ile Glu Arg Phe Lys

115 120 125

Ala Ile Lys Ala Cys Leu Gly Arg Asn Pro Glu Ala Phe Gln Pro Lys

130

135

140

Ile Gly Lys Gly Gln Leu Gly Asn Val Lys Pro Gln His Asn Lys Gly

145

150

155

160

Cys Asn Cys Arg Arg Ser Gly Cys Leu Lys Asn Tyr Cys Glu Cys Tyr

165

170

175

Glu Ala Gln Ile Met Cys Ser Ser Ile Cys Lys Cys Ile Gly Cys Lys

180

185

190

Asn Tyr Glu Glu Ser Pro Glu Arg Lys Thr Leu Met Ser Met Pro Asn

195

200

205

Tyr Met Gln Thr Gly Gly Leu Glu Gly Ser His Tyr Leu Pro Pro Thr

210

215

220

Lys Phe Ser Gly Leu Pro Arg Phe Ser His Asp Arg Arg Pro Ser Ser

225

230

235

240

Cys Ile Ser Trp Glu Val Val Glu Ala Thr Cys Ala Cys Leu Leu Ala

245

250

255

Gln Gly Glu Glu Ala Glu Lys Glu His Cys Ser Lys Cys Leu Ala Glu

260

265

270

Gln Met Ile Leu Glu Glu Phe Gly Arg Cys Leu Ser Gln Ile Leu His

275

280

285

Thr Glu Phe Lys Ser Lys Gly Leu Lys Met Glu

290

295

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 6

ggagaatctg cgacaggcac

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 7

tccccagcca agttctcsgg

20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 8

ttcattgacc tcaactacatg

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 9

gtggcagtga tggcatggac

20

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 10

tatgggcgcc tcctttcagc tgacaaat

28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 11

actgaggaag cagatggagc gctttgag

28

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 12

tgactgaggg aaactgctct ggtcat

26

<210> 13

<211>

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 13

aacctgatgg ctggcttgat

20

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a mouse gene

<400> 14

tttttcttta ctttccttgg

20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 15

ccgaagaagg gctccaagaa

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 16

tctccactca agacaagcct

20

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a human gene

<400> 17

tgggccagg gagtttactc a

21

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amplifying a human gene

<400> 18

tctcccagga ctatgggaac ccaa

24

<210> 19

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 19

tcgaattcta tggatgattg tcagctgaaa gga

33

<210> 20

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 20

gaattcgaat tcgcattccc ctttaccagc tt

32

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer for amprifing a mouse gene

<400> 21

accgtcgact gcctaaggctc ctgagaactt ggctgggga

39

<210> 22

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 22

Cys Leu Ser Gln Ile Leu His Ile Glu Phe Lys Ser Lys Gly Leu Lys

1

5

10

15

Ile Glu

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03859

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/47, 16/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12N15/12, C07K14/47, 16/18

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GENBANK/DBJ/EMBL/GENSEQ, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Mol. Endocrinol., 5, p.628-636, 1991 De, S.K., et al., "High level of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse"	1-9
A	Biochem. J., 231, p.279-283, 1985 Deagen, J.T. et al., "Properties of cadmium-binding proteins in rat testes. Characteristics unlike metallothionein"	1-9
A	Biochem. J., 231, p.375-382, 1985 Hunziker, P.E. et al., "Isolation and characterization of six human hepatic isometallothioneins"	1-9
A	Toxicology, 107, p.121-130, 1996 McKenna, I.M., et al., "Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated"	1-9
A	Histochemistry, 101, p.341-346, 1994 Tohyama, C., et al., "Metallothionein mRNA in the testis and prostate of the rat detected by digoxigenin-labeled riboprobe"	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
12 October, 1999 (12. 10. 99)Date of mailing of the international search report
2 November, 1999 (02. 11. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03859

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. Biol. Chem., 261, p.13097-13103, 1986 Waalkes, M.P. et al., "Isolation of a novel metal-binding protein from rat testes. Characterization and distinction from metallothionein"	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁶ C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)		
GENBANK/DDBJ/EMBL/GENESEQ BIOSIS/WPI (DIALOG)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Mol. Endocrinol., 5, p. 628-636, 1991 De, S. K., et al., "High level of metallothionein messenger RNAs in male germ cells of the adult mouse"	1-9
A	Biochem. J., 231, p. 279-283, 1985 Deagen, J. T. et al., "Properties of cadmium-binding proteins in rat testes. Characteristics unlike metallothionein"	1-9
A	Biochem. J., 231, p. 375-382, 1985 Hunziker, P. E. et al., "Isolation and characterization of six human hepatic isometallothioneins"	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日	12. 10. 99	国際調査報告の発送日
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 内田 俊生 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Toxicology, 107, p. 121-130, 1996 McKenna, I. M., et al., "Metallothionein gene expression in testicular interstitial cells and liver of rats treated"	1-9
A	Histochemistry, 101, p. 341-346, 1994 Tohyama, C., et al., "Metallothionein mRNA in the testis and prostate of the rat detected by digoxigenin-labeled riboprobe"	1-9
A	J. Biol. Chem., 261, p. 13097-13103, 1986 Waalkes, M. P. et al., "Isolation of a novel metal-binding protein from rat testes. Characterization and distinction from metallothionein"	1-9